



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Caracterización de las regiones organizadoras
nucleolares en las células del tumor venéreo
transmisibles en caninos: estudio histoquímica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Alberto RODRÍGUEZ IZAGUIRRE

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodríguez L. Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares en las células del tumor venéreo transmisibles en caninos: estudio histoquímica [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2007.

A Dios por darme la fuerza para seguir siempre adelante...ser responsable que en mi vida existan los mejores seres...y enseñarme actuar con amor y paciencia.

A mis padres Luis Alberto y Betty, por ser ejemplo de superación y consecución de los sueños; gracias por todo el gran amor que recibo a diario, por su cariño y el incondicional apoyo que siempre encontrare en ustedes.

Tal vez actuemos diferente y pensemos distinto pero el amor que siento por ustedes es único e interminable...a mis hermanos Raquel y Martín, por su paciencia e invaluable aliento en mi vida.

A mis amigos y casi hermanos Daniel, Sandra, Denisse y Víctor; que me tendieron la mano cuando más lo necesite, gracias por su comprensión y apoyo sincero.

Por su sincera amistad, compañerismo y estar siempre ahí; a Rossmery, Ricardito, Gino, y Viviana.

Nadie es perfecto...y yo soy un claro ejemplo de ello, Dios es testigo del amor mas sincero, digno y puro que te profeso y si en mis manos esta robarte una sonrisa o borrar una tristeza lo haría y me daría por ti...quien habita y cree en mi ser...quien me apoya incondicionalmente a ser cada día mejor...por ser la lucecita que siempre encontrare al final del camino...a mi trebolito...a mi compañera en este largo camino... a Mirella.

A la Dra. Rosa Perales por su paciencia, comprensión y sobre todo por su amistad incondicional, por ese corazón de amiga eterna.

Al Dr. Alfonso Chavera por su paciencia, consejo oportuno y por la sapiencia que caracteriza a un maestro.

Al Dr. Luís Tabacchi y al Dr. Gilberto Santillán, por todo su apoyo y amistad; por toodo el tiempo que duro el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Nieves Sandoval por su entusiasmo e invaluable ayuda.

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el apoyo del mismo y el financiamiento del CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES.

CONTENIDO

Resumen	iv
Abstract	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1. TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO	3
2.1.1. Etiología	3
2.1.2. Modo de transmisión	4
2.1.3. Signos clínicos	5
2.1.4. Inmunidad y regresión	5
2.1.5. Diagnóstico	6
2.1.5.1. Características macroscópicas	7
2.1.5.2. Características citológicas	8
2.1.5.3. Características histopatológicas	8
2.1.5.4. Características ultramicroscópicas	12
2.1.5.5. Características inmuohistoquímicas	12
2.1.6. Epidemiología	12

2.2. REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES	14
2.2.1. Definición	14
2.2.2. Impregnación con nitrato de plata	16
2.2.3. Visualización	18
2.2.4. Utilidad diagnóstica	18
2.2.4.1. Estudios en Medicina Humana	19
2.2.4.2. Estudios en Medicina Veterinaria	20
III. MATERIALES Y METODOS	22
3.1. LUGAR DE ESTUDIO	22
3.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	22
3.3. MATERIALES	22
3.4. METODOLOGIA	24
3.5. EVALUACION	25
3.6. ANÁLISIS DE DATOS	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSION	35
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. BIBLIOGRAFIA	42
IX. APENDICE	49

RESUMEN

La técnica histoquímica de coloración de las Regiones Organizadoras Nucleolares Argénticas (AgNORs) representa en la actualidad un marcador tumoral eficiente de la actividad proliferativa celular en la Patología Humana y con menor frecuencia en la Patología Veterinaria. El objetivo del presente estudio fue visualizar y caracterizar los AgNORs en 100 células neoplásicas del tumor venéreo transmisible canino por animal; para el cual se tomó 1 muestra por animal al azar del tejido parafinado perteneciente a 30 caninos diagnosticados histológicamente por hematoxilina y eosina (H y E) como TVT canino ingresados durante el año 2000 a 2006 al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Cada muestra fue cortada a cuatro micras, obteniéndose dos láminas por muestra; luego una de ellas fue coloreada con H y E para confirmar la viabilidad del tejido y visualizar las características de la neoplasia, la segunda lámina fue impregnada con nitrato de plata para marcar los AgNORs de las células neoplásicas. La ubicación de los AgNORs en las células neoplásicas del Tumor Venéreo Transmisible canino fue tanto en el núcleo como en el nucleolo, con un número medio por célula de 1.53, y un número medio de AgNORs por núcleo y nucleolo celular de 0.91 y 0.62 respectivamente; la distribución de los AgNORs del total de células evaluadas de TVT canino fue de 60.7% (1821/3000) en el núcleo, 34.3% (1029/3000) en el nucleolo y 5% (150/3000) tanto en el núcleo como nucleolo.

Palabras Claves: Regiones organizadoras nucleares, Tumor venéreo transmisible, Marcador tumoral, Neoplasia.

ABSTRACT

The argyrophilic Nucleolar Organizing Regions coloration technique, well-known as AgNORs represents at the present time an efficient tumorlike marker of proliferative activity in neoplastic cells in Human Pathology and with less frequency in Veterinary Pathology. The objective of the present study was to visualize and characterize the AgNORs in neoplásic cells of the transmissible venereal tumor in canines: for which takes 30 samples randomly tissue parafined of malignancies diagnosed histologically by hematoxylin and eosin (H and E) TVT canine entrants during the year 2000-2006 the Laboratory of Histology, Embryology and Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Each sample was cut to four microns, producing two sheets per sample; Then one of them was colored with H and E to confirm the viability of fabric and display the characteristics of malignancy, the second sheet was impregnated with silver nitrate to mark AgNORs of neoplastic cells.

It was concluded in the study that AgNORs are present in the tumor cell neoplastic Venéreo transmissible canine reaching the nucleus and / or nucleolus, with an average number per cell of 1,53, and an average number of AgNORs for nucleus and nucleolus cellular 0.91 and 0.62 respectively.

Key words: Nuclear organizing regions, canine transmissible venereal tumor, tumorlike marker, neoplasia.

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1:</i> Distribución de los AgNORs en la célula neoplásica del TVT canino	30
<i>Cuadro 2:</i> Media y desviación estándar de los AgNORs del total de células con TVT canino evaluadas	30
<i>Cuadro 3:</i> Media y desviación estándar de los AgNORs por animal evaluado	30
<i>Cuadro 4:</i> Media de los AgNORs en el núcleo relacionado al sexo	31
<i>Cuadro 5:</i> Media de los AgNORs en el nucleolo relacionado al sexo	31
<i>Cuadro 6:</i> Media de los AgNORs en el núcleo relacionado a la ubicación	31
<i>Cuadro 7:</i> Media de los AgNORs en el nucleolo relacionado a la ubicación	31

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Tumor Venéreo Transmisible canino genital (Base del pene)	9
<i>Figura 2:</i> Tumor Venéreo Transmisible canino genital (Perivulvar)	9
<i>Figura 3:</i> Tumor Venéreo Transmisible canino extragenital (Nasal)	10
<i>Figura 4:</i> Tumor Venéreo Transmisible canino extragenital (Labio)	10
<i>Figura 5:</i> Citología del Tumor Venéreo Transmisible canino (T15 100x)	11
<i>Figura 6:</i> Histología del Tumor Venéreo Transmisible canino (H-E 100x)	11
<i>Figura 7:</i> Visualización de los AgNORs en la célula neoplásica del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)	32
<i>Figura 8:</i> Histología de los AgNORs en el núcleo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (40x)	32
<i>Figura 9:</i> Histología de los AgNORs en el núcleo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)	33
<i>Figura 10:</i> Histología de los AgNORs en el nucleolo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)	33
<i>Figura 11:</i> Histología de los AgNORs en el núcleo y nucleolo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)	34
<i>Figura 12:</i> Distribución de los AgNORs en las células neoplasias	34

I.- INTRODUCCIÓN

El tumor venéreo transmisible canino (TVT canino) es único entre las neoplasias, debido a que se transmite rápidamente por transplante de células por contacto y su presentación, ya sea natural o experimental, deja en el paciente un buen estado inmunitario haciendo desaparecer esta neoplasia en forma espontánea, luego de varios meses; en casos más graves pero con una menor frecuencia se observa metástasis (Ferreira, 2003; Jones y Hunt, 1990; Jubb *et al.*, 1992).

El diagnóstico definitivo de neoplasias se realiza mediante la histopatología, que es una prueba diagnóstica que identifican el tipo y el grado de malignidad; pero es necesario desarrollar nuevas técnicas que midan otros parámetros biológicos que ayuden en la evaluación del tratamiento y en la probabilidad de vida del paciente, obteniendo así un pronóstico adecuado (López Muñoz *et al.*, 2001).

Entre estas se halla la técnica histoquímica de coloración de las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs) a través de la impregnación con nitrato de plata, por la cual se le denomina Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNORs). Los NORs son secciones de cromosomas metafísicos, donde se localizan copias organizadas de genes de rRNA (ácido ribonucleico ribosomal), necesarias para la producción final de ribosomas, que se relacionan directamente

con la actividad transcripcional y proliferativa de las células, evidenciándose al microscopio óptico como puntos negros distribuidos por el núcleo y/o nucleolo en muestras histológicas y citológicas (Giraldo *et al.*, 2003a).

El presente estudio tiene como objetivo visualizar, caracterizar y cuantificar histopatológicamente los AgNORs en las células neoplásicas del tumor venéreo transmisible canino, para que clínicamente se pueda evaluar la evolución y pronóstico de la neoplasia para el correspondiente monitoreo del paciente.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

2.1.1. Etiología

El tumor venéreo transmisible canino (TVT canino, sarcoma infeccioso, tumor venéreo contagioso, granuloma venéreo, condiloma canino, linfosarcoma transmisible, tumor de células reticulares transmisible, histiocitoma, tumor pegajoso y tumor de “Sticker”) es una neoplasia común en perros (Jones y Hunt, 1990; Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002).

Se considera que el TVT canino es un aloinjerto natural, transmitido por células neoplásicas viables a un huésped susceptible, a través del coito o por inoculación experimental (Scott *et al.*, 2002). Considerándose en un principio la posible intervención de algún agente infeccioso como virus o clamidias, pero estos no han sido identificados en la neoplasia, descartando así la intervención de agentes infecciosos (Rogers, 1997; Trigo, 1993).

Hasta el momento no se conoce el origen del TVT canino (Trigo, 1993), aunque en un inicio, por las características histológicas, se le considero como una neoplasia de células linfoides (Jones y Hunt, 1990). En la actualidad existen

estudios inmunohistoquímicos que avalan un origen histiocitario (Scott *et al.*, 2002).

Las células neoplásicas del TVT canino contienen 59 cromosomas, de los cuales 42 ó 43 son acrocéntricos mientras que 16 ó 17 son metacéntricos, respecto al complemento normal canino que contiene 78 cromosomas, en donde 76 son acrocéntricos y 2 metacéntricos (Jones y Hunt, 1990; Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002).

2.1.2. Modo de transmisión

Esta neoplasia en general se transmite durante el coito a partir de animales afectados hacia animales sanos, ubicándose en los órganos genitales de perros y perras con actividad sexual (Stephen, 1992).

En otros casos pero en menor cantidad se presentan implantaciones extragenitales, como resultado del lamido, mordedura, rascado u olfateo de la neoplasia de un animal enfermo a otro sano, o también por un autotransplante a partir de la neoplasia primaria (Ferreira, 2003; Jones y Hunt, 1990; Moulton, 1978; Stephen, 1992; Trigo, 1993).

Esta neoplasia puede ser inoculada en múltiples sitios mediante inyecciones subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales y por medio de escarificación de la piel o las mucosas, siendo su periodo de incubación de 3 semanas (Scott *et al.*, 2002).

Históricamente, el TVT canino es importante debido a que fue la primera neoplasia que pudo ser transmitida experimentalmente de un animal a otro, experimento realizado por el Médico Veterinario ruso M. A. Novinsky en 1863 (Jones y Hunt, 1990; Jubb *et al.*, 1992).

2.1.3. Signos clínicos

El asiento más común del TVT canino son los genitales externos (pene y vagina) y la piel (en especial cara y miembros), estas lesiones en un principio aparecen como áreas hiperémicas elevadas, que crecen hasta adquirir la forma de una coliflor, con frecuencia son friables y la superficie puede ser hemorrágica, lo que estimula al animal a lamerse excesivamente la zona; con el paso del tiempo, las lesiones se tornan necróticas, ulcerativas y complicarse con infecciones secundarias (Scott *et al.*, 2002; Stephen, 1992).

En áreas extragenitales los signos van a depender de la localización, como ejemplo de ello el TVT canino ubicado en la mucosa nasal da origen a descargas unilaterales o bilaterales; en una localización oral existe dificultad al ingerir los alimentos y deformación maxilar (Rogers, 1997). Las neoplasias oculares pueden crecer en la conjuntiva y en el párpado causando ceguera, las implantaciones cutáneas, ubicadas principalmente en la cara, miembros, espalda y en menor cantidad en cualquier otra parte del cuerpo, presentan las mismas características que la neoplasia primaria (Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002).

2.1.4. Inmunidad y regresión

Existen casos experimentales de regresión espontánea del TVT canino, sin embargo, en casos naturales es muy raro y esporádico (Scott *et al.*, 2002). En ambos casos la regresión de la neoplasia se da en menos de seis meses, dejando en el paciente un estado inmunitario competente a subsecuentes implantaciones de células neoplásicas (Ferreira, 2003; Jones y Hunt, 1990; Jubb *et al.*, 1992).

Todo ello ocurre debido a la actividad de las células B, T y plasmáticas que participan en una respuesta inmunitaria eficaz contra las células neoplásicas del TVT canino (Scott *et al.*, 2002).

Durante el crecimiento progresivo de la neoplasia, se producen anticuerpos séricos que pueden bloquear la lisis de células neoplásicas (Scott *et al.*, 2002).

En casos de pacientes inmunosuprimidos o neonatos existe un incremento de la malignidad y de la neoplasia (Scott *et al.*, 2002).

Se ha reportado desde el año 2000, en la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, cuatro casos de pacientes con TVT canino genital recidivante donde cada animal fue tratado con quimioterapia (vincristina), cuya administración semanal fue de 0.05 mg/m² durante 5 semanas logrando la desaparición clínica de la neoplasia. Sin embargo, luego de 5-6 meses los pacientes presentaron recurrencia, la terapia volvió a ser con vincristina (misma dosis) pero durante 8 semanas, consiguiendo así hasta hoy la resolución completa del TVT canino (Diego Díaz MV, Comunicación personal, 2007).

Un caso aislado de un paciente con TVT canino genital también fue reportado, cuyo tratamiento con vincristina (0.05 mg/m²) no mostro mejoría, por lo que tuvo que ser tratado con otro fármaco, doxorrubicina a 0.5 mg/m², pero la neoplasia no cedió a la quimioterapia siendo el paciente eutanasiado debido a la complicación y crecimiento ilimitado de la neoplasia (Diego Díaz MV, Comunicación personal, 2007).

2.1.5. Diagnóstico

Para llegar a un diagnóstico certero se deben tener en cuenta varios pasos a seguir, desde un conocimiento completo de los antecedentes del paciente, con una especial atención en el historial reproductivo así como el contacto con otros perros, hasta las pruebas de laboratorio correspondientes (Moulton, 1978; Stephen, 1992).

Otros pasos a seguir son la identificación de los signos clínicos, con la presencia de la neoformación en los genitales, la cual puede ser acompañada de zonas hemorrágicas, así como los signos del TVT canino extragenital, dependiendo de la ubicación (Rogers, 1997; Stephen, 1992).

2.1.5.1. Características macroscópicas

El TVT canino puede ser solitario o múltiple, nodular, pedunculado, multilobular o en forma de coliflor. El diámetro de la neoplasia varía desde un pequeño nódulo de 5 mm hasta uno de 20 cm., de consistencia firme o friable, con una superficie hemorrágica, ulcerada y generalmente con infección secundaria; la coloración varía de un rojo pálido a brillante (Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002; Trigo, 1993). En el macho el lugar de afección rutinario es la superficie externa de la base del pene (**Figura Nº 1**), pudiendo también alojarse en la superficie epitelial interna (capa visceral o parietal) del prepucio y en el glande. En la hembra la neoplasia se origina en la submucosa de la pared de la vagina en forma de proliferaciones papilares penetrando y atravesando el epitelio, el que se proyecta a la luz de la vagina pudiendo sobresalir de la vulva, tal como se aprecia en la **Figura Nº 2** (Ferreira, 2003; Jubb *et al.*, 1992; Moulton, 1978; Stephen, 1992).

Las implantaciones extragenitales se ubican principalmente en el tejido cutáneo (cara, hombros, miembros y espalda) como se muestra en la **Figura Nº 3** y **Figura 4**, y en la mucosa nasal dando origen a descargas con variable cantidad de sangre, causando estornudos y en casos muy avanzados dificultad respiratoria, fístulas oronasales y deformación nasal; esporádicamente se puede hallar también en el escroto, área perineal, linfonódulos regionales, hígado, riñón, ganglio mesentérico, peritoneo, pulmón y SNC. Todas estas con las mismas características macroscópicas que la neoplasia primaria (Ferreira, 2003; Jones *et al.*, 1990; Moulton, 1978; Stephen, 1992; Trigo, 1998).

2.1.5.2. Características Citológicas

Se observan células redondas u ovoides agrupadas y en algunos casos formando nidos celulares, la relación núcleo/citoplasma esta ligeramente aumentada debido a la presencia de uno o dos grandes núcleos redondos conteniendo un patrón de cromatina gruesa; el citoplasma, en una cantidad moderada y de un color basófilo claro turbio presenta límites marcados y múltiples vacuolas pequeñas, separadas y claras (**Figura Nº 5**); las figuras de mitosis son abundantes y frecuentes (Cowell *et al.*, 1999; Rebar, 1977; Scott *et al.*, 2002; Stephen, 1992). También se observan la presencia de linfocitos, neutrófilos y macrófagos durante la fase regresiva y en el caso que la neoplasia se encuentre ulcerada se visualizara la presencia de bacterias, neutrófilos y células epiteliales. (Cowell *et al.*, 1999).

2.1.5.3. Características Histopatológicas

Se caracteriza por presentar las células neoplásicas como láminas compactas, encontrándose también formas celulares atípicas redondas, ovoides y poliédricas, que se disponen en forma de racimos o hileras sobre un fino estroma de tejido fibroso vascularizado. En estas células neoplásicas se observan la presencia de núcleos grandes, redondos e hipercromáticos, algunas de estas con uno o dos nucleolos redondos muy prominentes y un citoplasma en moderada cantidad y levemente eosinófilo; las figuras de mitosis son abundantes (**Figura Nº 6**), llegando ha ser de 6 a 8 por campo. La infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas son muy frecuentes teniendo una distribución irregular (Ferreira, 2003; Jubb *et al.*, 1992; Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002; Trigo, 1998).

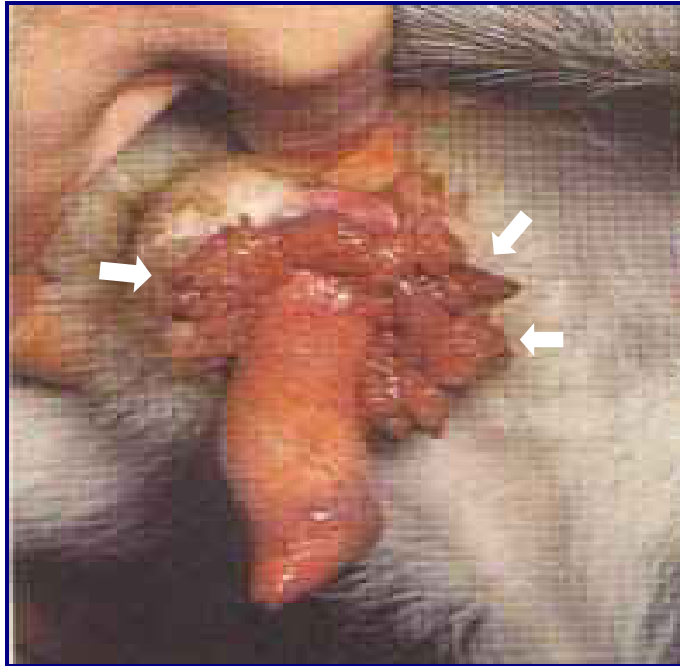


Figura 1: Tumor Venéreo Transmisible canino genital
(Base del pene)



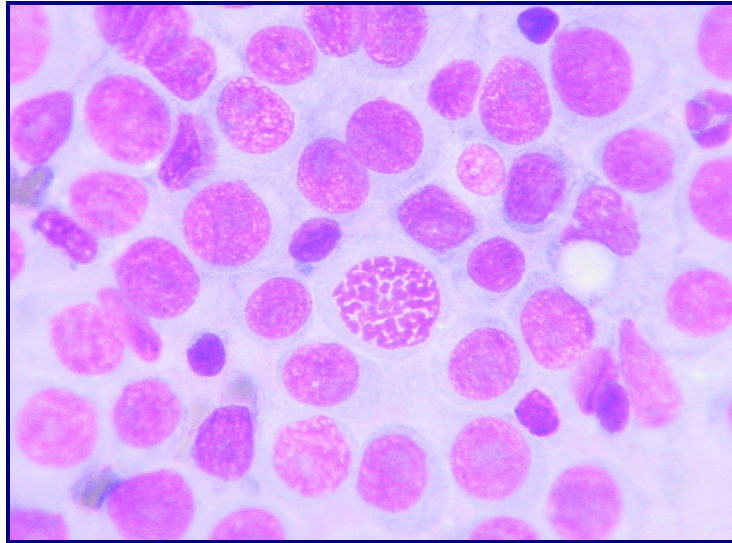
Figura 2: Tumor Venéreo Transmisible canino genital
(Perivulvar)



Figura 3: Tumor Venéreo Transmisível canino extragenital (Nasal)



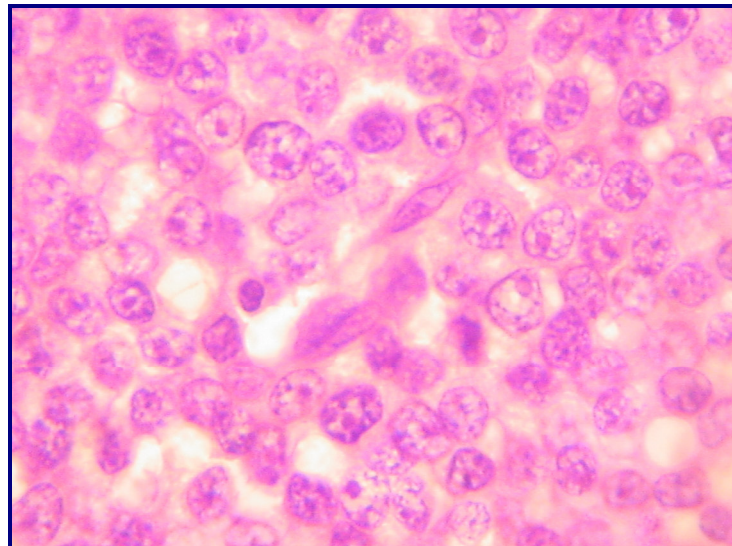
Figura 4: Tumor Venéreo Transmisível canino extragenital (Labio)



FUENTE: Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria FMV UNMSM

Figura 5: Citología del Tumor Venéreo Transmisible canino (T15 100x)

Células redondas con una cantidad variable de citoplasma basófilo claro y turbio con límites marcados y múltiples vacuolas; núcleos circulares con variación de tamaño, de cromatina gruesa y con la presencia de uno o dos nucleolos.



FUENTE: Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria FMV UNMSM

Figura 6: Histología del Tumor Venéreo Transmisible canino (H-E 100x)

Laminas compactas de células neoplásicas poliédricas de núcleo grande central e hiper cromático con uno o dos nucleolos y abundantes figuras de mitosis, estas células están rodeados por un delicado estroma pseudoacinar fibroso y vascularizado.

Las neoplasias con regresión espontánea también presentan hemorragia, edema e infiltración de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y haces de colágeno. En el caso de las neoplasias que presentan metástasis o que son trasplantadas se observa un aspecto histológico similar a las neoplasias primarias (Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002).

2.1.5.4. Características Ultramicroscópicas

Ultraestructuralmente el citoplasma presenta pequeñas mitocondrias libres de ribosomas y vacuolas que se hallan completamente dispersas; la superficie celular contiene muchas microvellosidades las cuales están en íntimo contacto con las células contiguas (Chevile, 1983).

2.1.5.5. Características Inmuhistoquímicas

En algunos casos para poder llegar al diagnóstico del TVT canino se hace uso de la inmunohistoquímica, debido a que esta neoplasia presenta un alto grado de células atípicas, siendo confundido con otras neoplasias como: Linfomas, plasmocitomas, mastocitomas e histiocitomas (Stephen, 1992). Esta técnica diagnóstica emplea diversos marcadores de neoplasias, siendo el TVT canino positivo a la vimentina, marcador que reconoce células de origen mesenquimal; también es positivo a la lisozima y A-1 antitripsina, que son marcadores de tumores de células histiocíticas y positivos también para ACM1 (marcador de células del sistema fagocitario mononuclear); y negativo para la citoqueratina, el cual detecta células epiteliales (Scott *et al.*, 2002; Zuccari *et al.*, 2002).

2.1.6. Epidemiología

El TVT canino tiene una distribución mundial, siendo las zonas marginales de ciudades superpobladas de países en desarrollo las más afectadas, debido a la alta concentración de perros vagabundos, al pobre control de crianza y sobretodo a la reproducción sin control (Moulton, 1978; Scott *et al.*, 2002).

Muchos estudios afirman que ambos sexos sufren lesiones genitales durante el coito, siendo los mas afectados los animales que tienen mayor actividad sexual, cuyas edades comprenden entre los 2 y 7 años sin existir predisposición de sexo ni de raza; varios reportes indican que gran proporción de perros afectados son de raza cruzada (Moulton, 1978; Rogers, 1997; Scott *et al.*, 2002).

Un estudio sobre casuística del Tumor Venéreo Transmisible Canino realizado durante el periodo de 1998-2004 en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima-Perú) encontró una frecuencia de TVT canino de 8.43% sobre otras neoplasias (78/925); siendo los animales más afectados los de raza cruzada con edades que oscilaron entre 1 y 5 años, sin existir predisposición del sexo (Mendoza, 2006).

2.2. REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES

2.2.1. Definición

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) son segmentos de ADN que codifican el ARN ribosómico para la síntesis de proteínas, siendo descritas por primera vez por Heitz en 1931 y Mc Clintock en 1934. Posteriormente mediante técnicas de hibridación *in situ* se localizo los NORs en las bandas cortas de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 de las células eucarióticas del hombre (Derenzini, 2000; López-Muñiz *et al.*, 2001; Orellana *et al.*, 2004; Yasdi y Taghavi, 2005).

Una serie de investigaciones ultraestructurales han demostrado que durante la interfase del ciclo celular los NORs están localizados en los componentes fibrilares del nucleolo, evidenciándose además que los centros fibrilares más el componente fibrilar denso son las estructuras nucleolares que se impregnan con el nitrato de plata para visualizar los NORs (Derenzini y Plotón, 1994).

Investigadores como Howel y Black en 1980 determinaron que los NORs también contienen un conjunto de nucleoproteínas de tipo acídicas no histónicas, que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica, denominándose entonces Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNOR), siendo luego en 1982 confirmado por Plotón, y estableciendo que estas

proteínas son las responsables de la impregnación del nitrato de plata en los NORs (Fonseca y Carmo, 2000; Orellana *et al.*, 2004; Plotón *et al.*, 1986; Trerè, 2000).

Posteriormente, mediante técnicas electroforéticas, se identificó a las proteínas AgNORs durante la interfase del ciclo celular (al menos las que se expresaron en mayor cantidad). La *nucleolina* (una fosfoproteína de 105 kDa) la cual cumple un papel importante en la transcripción de las moléculas de ARNr, y la *nucleofosmina* o proteína B23 (una fosfoproteína de 38-39 kDa) involucrada en las fases finales de la organización de la partícula pre-ribosomal (Derenzini, 2000; Giraldo *et al.*, 2003b; Sirri *et al.*, 2000).

La función exacta de las proteínas NORs es incierta, debido a que el mecanismo por medio del cual se controlan los índices de proliferación de los diferentes tipos de células es uno de los aspectos menos comprendidos dentro de la biología celular, sin embargo se ha demostrado su relación con la proliferación celular (Leyva *et al.*, 2004).

Existe evidencia que en células en proliferación, la cantidad de proteínas AgNORs (*nucleolina* y *nucleofosmina*) se incrementa progresivamente desde la fase G1 temprana, alcanzando un valor máximo al final de la fase S y permanece constante hasta el final de la fase G2 (Nikicicz y Norback, 1990; Sirri *et al.*, 2000).

Estudios que datan de 1980 indican una relación entre la cantidad de proteínas AgNOR y la rápida proliferación celular, evidenciándose un frecuente crecimiento de los AgNOR en células malignas comparadas con células benignas o células normales (Fonseca y Carmo, 2000; Giuffrè *et al.*, 1998; Trerè, 2000).

Por lo que el número, localización, disposición, intensidad de tinción y morfología de los AgNORs es altamente variable de acuerdo a la actividad transcripcional del ARNr, siendo demostrado en diversos estudios tener relación con la actividad transcripcional y diferenciación celular, así como con la actividad proliferativa tumoral, reflejando el estadio de activación y el grado de transformación maligna de ciertos tejidos (Donofrio *et al.*, 1995; Schwint *et al.*, 1994; Sirri *et al.*, 2000; Trerè, 2000).

2.2.2. Impregnación con nitrato de plata

Plotón *et al* (1986) llevaron a cabo la primera aplicación del parámetro AgNOR en la oncología, demostrando la presencia de una cantidad muy alta de AgNORs en las células neoplásicas del cáncer de próstata humano comparadas a las correspondientes células benignas e hiperplásicas, logrando así con éxito la localización precisa de los NORs en muestras citológicas e histológicas de rutina, aplicando un protocolo de impregnación de nitrato de plata con ácido fórmico **(Apéndice N° 1)**.

Estudios llevados a cabo en diferentes laboratorios sobre diversas neoplasias fueron publicados después de este trabajo pionero, teniendo la posibilidad de distinguir una célula maligna de una no maligna sobre la base de una distribución cuantitativa de AgNOR (Derenzini, 2000).

Todas estas investigaciones toman como patrón original el protocolo de la técnica de impregnación de nitrato de plata descrita por Plotón, pero con algunas modificaciones para incrementar la calidad de la tinción y disminuir a la vez los depósitos inespecíficos de plata metálica que dificulta la correcta visualización de los AgNORs de las muestras citológicas e histológicas (Palomo *et al.*, 2002). Las modificaciones son detalladas a continuación.

El uso del *cloruro de oro al 0.05 %* contribuye a resaltar la tinción de plata, delimitando las estructuras argirofílicas. El reemplazo de la plata metálica por oro consiste en una reacción de oxidación-reducción, en los sitios donde esta se depositó. Con esto se logra una notable reducción de la tinción de fondo no específica de la cromatina nuclear, haciendo que los AgNORs sean claramente definidos (Delahunt *et al.*, 1991).

El *tiosulfato sódico al 5%* ayuda a conseguir una tinción permanente de la plata (fijación de la impregnación argéntica) y eliminación, en gran parte, de la tinción no específica de fondo (Linder, 1993).

Öfner *et al.* (1994) han demostrado que la exposición de rutina de secciones a altas temperaturas (120°C), ya sea en autoclave húmeda, horno microonda u olla a presión, en una *solución amortiguadora de citrato (10 mM, pH 6.0)* por 20 minutos mejora la calidad de la tinción AgNOR, permitiendo una visualización más reproducible de las proteínas AgNORs, debido a que las muestras fijadas en formol, frecuentemente conduce a la pobre calidad de la tinción de plata, probablemente debido a un variable efecto de “enmascaramiento” del fijador sobre las proteínas celulares.

Considerando las numerosas variables, las cuales influyen en la tinción de los NOR, el protocolo de tinción descrito por Plotón necesita ser estandarizado con el objetivo de obtener datos reproducibles entre los diferentes laboratorios; por este motivo se fundó, durante el primer taller de “Los AgNORs en la Oncología” realizado en Berlín en 1993, el “Comité Internacional sobre Cuantificación de los AgNORs”, definiendo por primera vez las indicaciones para la evaluación de la proteína AgNOR y estableciendo un protocolo de impregnación del nitrato de plata (**Apéndice N° 2**) (Trerè, 2000).

2.2.3. Visualización

Los NORs impregnados con nitrato de plata se observan perfectamente a través del microscopio óptico como puntos redondos o elongados negros bien definidos, dentro del núcleo y/o nucleolo en células normales y neoplásicas en muestras histológicas y citológicas (Giraldo *et al.*, 2003a; Plotón *et al.*, 1986; Sirri *et al.*, 2000).

El número, área ocupada y distribución de los NORs dentro del núcleo y/o nucleolo depende de la actividad trascricional del RNA y del estadio celular. Por lo tanto, la evaluación de estos parámetros permite obtener información sobre la función de los NORs (Warnakulasuriya y Jonson, 1993).

2.2.4. Utilidad Diagnóstica

Esta técnica de impregnación argéntica se ha utilizado en las tres últimas décadas como un marcador tumoral eficiente en la patología humana, mientras en patología veterinaria en los últimos tiempos ha despertado un creciente interés debido a la simplicidad, bajo costo y por ser útil para emitir pronósticos de lesiones neoplásicas como en la evaluación de tratamientos, además de permitir visualizar el tipo y el grado de proliferación de las células neoplásicas, ya que los NORs impregnados con plata (AgNORs) representan un marcador histoquímico económico, sencillo y eficiente de la proliferación celular y de la malignidad celular. (Giraldo *et al.*, 2003b; Rosciani *et al.*, 2003; Trerè, 2000).

Los diferentes parámetros de cuantificación de AgNORs (número, tamaño y distribución) pueden ayudar a discriminar entre neoplasias benignas y malignas, tanto en muestras citológicas como histológicas (Cabrini *et al.*, 1994; Fonseca y Carmo, 2000; Giuffrè *et al.*, 1998), sin embargo, cabe recordar que el grado transformación morfológica de la célula maligna esta dado por la histopatología. Por lo tanto éste método puede ser un auxiliar como marcador cuantitativo en alteraciones celulares incipientes, antes que los cambios morfológicos puedan ser

detectados histológicamente, considerándose un parámetro de gran valor en la oncología, ya que un incremento en el número de ellos, esta asociado a la agresividad de la neoplasia maligna (Öfner *et al.*, 1996; Pich *et al.*, 2000; Ruschoff *et al.*, 1993; Warnakulasuriya y Jonson ,1993; Xie *et al.*, 1997).

2.2.4.1. Estudios en Medicina Humana

Estudios realizados en lesiones melánicas benignas y malignas de piel demostró que el número de AgNORs provenientes de células epidérmicas normales y de lesiones névicas benignas, tanto en los estratos basales como intermedios, tuvieron un número de AgNORs igual o inferior a 3 por células; mientras en melanomas malignos el número siempre fue superior a 3 AgNORs por célula. Evidenciándose así, que un elevado número de AgNORs es signo de un pronóstico desfavorable en la evolución de los melanomas malignos (López-Muñiz *et al.*, 2001).

En neoplasias foliculares tiroideas se observó un número de AgNORs por núcleo celular mayor en los carcinomas que en los adenomas, llegándose a encontrar en algunos casos hasta 5 AgNORs por núcleo celular; siendo de igual mayor la disposición de los AgNORs agrupados (versus dispersos) en los carcinomas (Palomo *et al.*, 2002).

En el caso de lesiones epiteliales de cavidad bucal se presentó un promedio de 6 AgNORs por célula en el carcinoma epidermoide; mientras en el carcinoma basocelular un número de 3 AgNORs por célula, demostrándose así una correlación estadística positiva, donde el número de AgNORs aumenta según el grado de malignidad (Leyva *et al.*, 2004).

Otros estudios en cavidad oral evidenciaron en hiperplasias 2 AgNORs por célula, en el papiloma 4 AgNOR por célula, carcinoma epidermoide diferenciado 7 AgNOR por célula y carcinoma epidermoide pobremente diferenciado 8 AgNORs

por célula. Por lo tanto, cuanto mas indiferenciado sea la neoplasia mayor será el número de AgNORs, afianzando así la relación existente entre el numero de AgNORs y el grado de malignidad de la neoplasia (Fonseca y Carmo, 2000).

Estudios en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores mostraron un promedio de 3.83 AgNORs por núcleo para el primer grupo de individuos, mientras para los no fumadores el número de AgNORs fue de 2.79 por célula (Orellana *et al.*, 2004).

Evaluaciones de AgNORs en linfomas no Hodgkin's de cabeza y cuello mostraron un promedio de AgNORs por célula de 1.66 en neoplasias de bajo grado, 2.52 en neoplasias de grado intermedio y en neoplasias de alto grado un promedio de 5.19 AgNORs por célula (Yasdi y Taghavi, 2005).

Estudios realizados en células mesoteliales y células malignas de efusiones de cavidad peritoneal y cavidad pleural demostraron un promedio de AgNORs por célula de 3.04 para el primer grupo; y para el segundo un promedio de 10.62, AgNORs por célula, además de existir en este grupo una distribución irregular y una heterogeneidad en el tamaño de los AgNORs (Akhtar *et al.*, 2004).

2.2.4.2. Estudios en Medicina Veterinaria

Estudios realizados en neoplasias cutáneas caninas evidenciaron la presencia de AgNORs distribuidos por todo el núcleo, para el caso de los carcinomas espinocelulares y basocelulares, mientras en los mastocitomas los AgNORs se hallaron tanto en el núcleo como nucleolo, demostrando así una importante relación entre el grado de malignidad y de dispersión de los AgNORs en la célula, sugiriendo que la ubicación de estas, sólo en el núcleo es común en células altamente malignas (Giraldo *et al.*, 2003a).

En el Adenocarcinoma prostático canino el número de AgNORs hallados estuvo en un rango de 2.76-4.68 por célula tumoral (Silva y Correira, 2002).

Evaluaciones realizadas en nódulos linfáticos en perros controles versus nódulos linfáticos en perros con linfoma demostraron un promedio de AgNORs por núcleo celular de 1.4 para el primer grupo, mientras para los pacientes con linfoma el promedio fue de 2.9 AgNORs por célula (Vajdovich *et al.*, 2004).

Otros reportes evidenciaron la presencia de AgNORs en tumores mamarios caninos tanto en el núcleo como nucleolo con un número medio por célula de 4.46 en el Adenocarcinoma, 3.98 en el tumor mamario mixto maligno y 3.68 en el tumor mamario mixto benigno (Giraldo *et al.*, 2003b).

La aplicación del parámetro AgNOR en la oncología, es un factor importante y valioso para definir el pronóstico de la enfermedad cancerígena debido a que los cambios cuantitativos de los AgNORs se encuentra relacionado a la rápida expansión de la masa neoplásica y la tasa de crecimiento, brindándonos así información sobre la progresión de la enfermedad neoplásica del paciente (Derenzini, 2000).

III.- MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

La selección, procesamiento, lectura y diagnóstico histoquímico de los casos diagnosticados histopatológicamente como Tumor Venéreo Transmisible canino, se desarrollo en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

De acuerdo al Teorema del Limite Central de Teoría Avanzada de Probabilidades, que afirma que la precisión de la muestra mejora al crecer N (tamaño muestral), que en el caso de valores grandes, viene a ser mayor o igual a 30 (Spiegel, 1991); por lo que se considero esta como la cantidad mínima significativa para realizar el presente estudio.

3.3. MATERIALES

Se tomo 1 muestra por animal al azar de tejido parafinado de 30 caninos de diferentes edades, razas, sexo y ubicación de la neoplasia (**Apéndice Nº 6**), diagnosticados histopatológicamente con hematoxilina y eosina (H y E) como TVT

canino, ingresados al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria entre los años 2000 al 2006.

3.3.1. Materiales para el procesamiento de muestras

- *Alcohol de 70º*
- *Alcohol de 96º*
- *Alcohol absoluto*
- *Xilol*
- *Guantes quirúrgicos*
- *Láminas cubreobjetos*
- *Láminas portaobjetos*
- *Colorante H y E*
- *Micrótomo*
- *Agua destilada*
- *Jarras coplin*
- *Olla a presión*
- *Coloración argéntica para AgNOR*
- *Solución citrato buffer*
- *Bálsamo de Canadá*
- *Estufa*

3.3.2. Material fotográfico

- *Cámara digital Sony 3.2 megapíxeles*

3.3.3. Materiales para análisis de muestras

- *Microscopio óptico biocular Ortoplan Leitz*
- *Microscopía para microfotografía Ortoplan Leitz*

3.4. METODOLOGIA

- Detección de los casos diagnosticados histopatológicamente como Tumor Venéreo Transmisible canino de los archivos del laboratorio.
- Recolección de las 30 muestras al azar de los tejidos incluidos en parafina.
- Corte con el micrótopo de cada muestra de los tejidos incluidos en parafina a 4 micras de grosor, obteniéndose 2 láminas de muestra por tejido.
- Incubación de las láminas en una estufa por 24 horas a 37°.
- Exposición a temperatura ambiente por 24 horas de las 0 láminas.
- Desparafinar las láminas:
 - Xilol 1 por 5 minutos
 - Xilol 2 por 5 minutos
- Hidratar las láminas:
 - Alcohol absoluto por 5 minutos
 - Alcohol 96° por 5 minutos
 - Alcohol 70° por 5 minutos
- Lavar con agua destilada las láminas.
- *Coloración Hematoxilina-Eosina:*

Una de las láminas de la muestra será coloreada con hematoxilina y eosina (H y E) para determinar la viabilidad del tejido y visualizar las características de la neoplasia.
- *Coloración Argéntica:* Mediante el protocolo propuesto por el Comité Internacional para la Cuantificación de los AgNORs.

La otra lámina de la muestra será sumergida en citrato buffer (**Apéndice N°3**) en jarras coplin de plástico a 120° por 20 minutos en una olla a presión, antes de ser impregnada con nitrato de plata.
- Enfriar a temperatura ambiente las láminas.
- Lavar con agua destilada las láminas.
- Incubar las láminas en una solución argéntica de nitrato de plata (**Apéndice N°4**) en la oscuridad y a una temperatura constante de 37° por 13 minutos.

- Lavar con agua destilada las láminas.
- Deshidratar las láminas:
 - Alcohol 70º por 5 minutos.
 - Alcohol 96º por 5 minutos.
 - Alcohol absoluto por 5 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol por 5 minutos.
- Montaje y lectura en microscopio óptico de las láminas con la muestra.

3.5. EVALUACIÓN

Los AgNORs se visualizan como puntos redondos o elongados negros bien definidos distribuidos en el núcleo y/o nucleolo usando microscopia óptica con objetivo 100x y aceite de inmersión como se observa en la **Figura Nº 7**. La cuantificación de los AgNORs en las células atípicas del TVT canino se realizó evaluando 20 células elegidas al azar por 5 campos distintos de cada muestra, obteniendo así las 100 células estudiadas por animal.

El parámetro evaluado en base a la cuantificación de los AgNORs en las células neoplásicas fue de acuerdo al:

- Número de AgNORs por célula.
- Número de AgNORs por núcleo celular.
- Número de AgNORs por nucleolo celular.

Mientras que el parámetro en base a la distribución de los AgNORs en las células neoplásicas (**Figura Nº 12**) se determinó como:

- AgNORs en el núcleo.
- AgNORs en el nucleolo.
- AgNORs en el núcleo y nucleolo.

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de tipo descriptivo, en el que se utilizó la media como medida de tendencia central y como medida de dispersión la desviación estándar (SD). Los resultados de los parámetros de distribución se llevaron a una valoración porcentual.

IV.- RESULTADOS

Se tomaron 30 muestras al azar pertenecientes a caninos diagnosticados histológicamente como Tumor Venéreo Transmisible canino de diferentes edades, sexo, raza y ubicación de la neoplasia; ingresados durante los años 2000 al 2006 al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las edades de los animales estuvo entre un rango de 2 a 9 años, con respecto a la raza los mas frecuentes fueron los de origen cruzado (22/30), en cuanto al sexo de los animales se encontró que 16 fueron machos (16/30) y 14 fueron hembras (14/30), la procedencia de la neoplasia fue de 16 animales con TVT canino ubicados genitalmente (16/30) y 14 con TVT canino extragenital (14/30) (**Apéndice Nº 6**), siendo distribuidos de acuerdo al sexo, edad y ubicación de la neoplasia (**Apéndice Nº 5**); en los protocolos de recepción no consta si la neoplasia fue inicial, recidivante o tratada con antineoplásicos. Todos estos datos han sido considerados solamente como información referencial en el presente estudio.

La coloración de Hematoxilina y Eosina (H y E) permitió confirmar la viabilidad del tejido y visualizar las características histopatológicas de los 30 casos de TVT caninos analizados.

Con la coloración del nitrato de plata los AgNORs se observaron como puntos redondos o elongados teñidos de negro dentro de las células ubicados en el núcleo, otros en el nucleolo; y en algunas células en ambas estructuras celulares; el resto de la célula se tiñó de color amarillo pardo, tal como se observa en la **Figura N° 8**.

Los AgNORs variaron en cuanto a número y tamaño, observándose en la mayoría de las células, pequeños y en gran número; llegándose a encontrar en una neoplasia extragenital (encía) de un animal hasta 6 AgNORs por núcleo celular.

El **cuadro N° 1** muestra el porcentaje de ubicación de los AgNORs del total de células con TVT canino evaluadas, encontrando un 60.7% (1821/3000) en el núcleo (**Figura N° 9**), 34.3% (1029/3000) en el nucleolo (**Figura N° 10**) y 5% (150/3000) tanto en el núcleo como nucleolo (**Figura N° 11**).

La media de AgNORs del total de células con TVT canino evaluadas fue de 1.53; mientras que los AgNORs ubicados en el núcleo de la célula tuvo una media de 0.91, y los ubicados en el nucleolo 0.62 (**cuadro N° 2**).

Así mismo, la media de AgNORs por animal con TVT canino (100 células observadas) fue de 152.5; siendo 90.67 y 61.83 las medias de los AgNORs ubicados en el núcleo y nucleolo respectivamente, no existiendo diferencia estadística significativa como se muestra en el **cuadro N° 3**.

Como datos adicionales se realizó la prueba de t de student para determinar la relación entre el sexo y la ubicación de los AgNOR en el núcleo (**cuadro N° 4**), al igual que en el nucleolo (**cuadro N° 5**) por cada animal, no encontrándose diferencia estadística significativa.

El estudio mostró también que no existía diferencia estadística significativa entre la procedencia de la neoplasia y la ubicación de los AgNOR en el núcleo (**cuadro Nº 6**) y nucleolo (**cuadro N º 7**) en la célula por cada animal.

Con respecto a la raza y edad, debido a que las muestras fueron obtenidas al azar, el número del tamaño muestral no permitió confrontar estadísticamente estos datos con el número de AgNORs en las células neoplásicas del TVT canino.

CUADRO1. DISTRIBUCION DE LOS AgNORs EN LA CELULA NEOPLASICA DEL TVT canino

TUMOR	NUMERO DE CASOS	CAMPOS POR CASOS	CELULA POR CAMPO	TOTAL DE CELULAS	DISTRIBUCION (%)		
					1	2	3
TVT Canino	30	5	20	3000	60.7	34.3	5

1: AgNORs distribuidos en el núcleo

2: AgNORs distribuidos en el nucleolo

3: AgNORs distribuidos en el núcleo y nucleolo

CUADRO 2. MEDIA Y DESVIACIÓN STANDAR DE LOS AgNORs DEL TOTAL DE CÉLULAS CON TVT canino EVALUADAS

VARIABLE	TOTAL DE CELULAS	MEDIA	DESV. STAND.
AgNORs-célula	3000	1.53	0.87
AgNORs-núcleo celular	3000	0.91	0.85
AgNORs-nucleolo celular	3000	0.62	0.87

CUADRO 3. MEDIA Y DESVIACIÓN STANDAR DE LOS AgNORs POR ANIMAL EVALUADO

VARIABLE	ANIMALES	MEDIA	DESV. STAND.
AgNORs-célula	30	152.50	19.75
AgNORs-núcleo celular	30	90.67	24.73
AgNORs-nucleolo celular	30	61.83	31.51

**CUADRO 4. MEDIA DE LOS AgNORs EN EL NUCLEO
RELACIONADO AL SEXO**

SEXO	ANIMALES	MEDIA	ERROR STAND.	DESV. STAN.
Hembra	14	86.50	6.12	22.89
Macho	16	94.31	6.61	26.42

**CUADRO 5. MEDIA DE LOS AgNORs EN EL NUCLEOLO
RELACIONADO AL SEXO**

SEXO	ANIMALES	MEDIA	ERROR STAND.	DESV. STAN.
Hembra	14	62.43	9.11	34.07
Macho	16	61.31	7.55	30.21

**CUADRO 6. MEDIA DE LOS AgNORs EN EL NUCLEO
REALACIONADO A LA UBICACIÓN**

UBICACIÓN	ANIMALES	MEDIA	ERROR STAND.	DESV. STAN.
extragenital	14	93.36	7.51	28.09
genital	16	88.31	5.51	22.05

**CUADRO 7. MEDIA DE LOS AgNORs EN EL NUCLEOLO
RELACIONADO A LA UBICACIÓN**

UBICACIÓN	ANIMALES	MEDIA	ERROR STAND.	DESV. STAN.
extragenital	14	57.79	9.01	33.71
genital	16	65.38	7.52	30.09

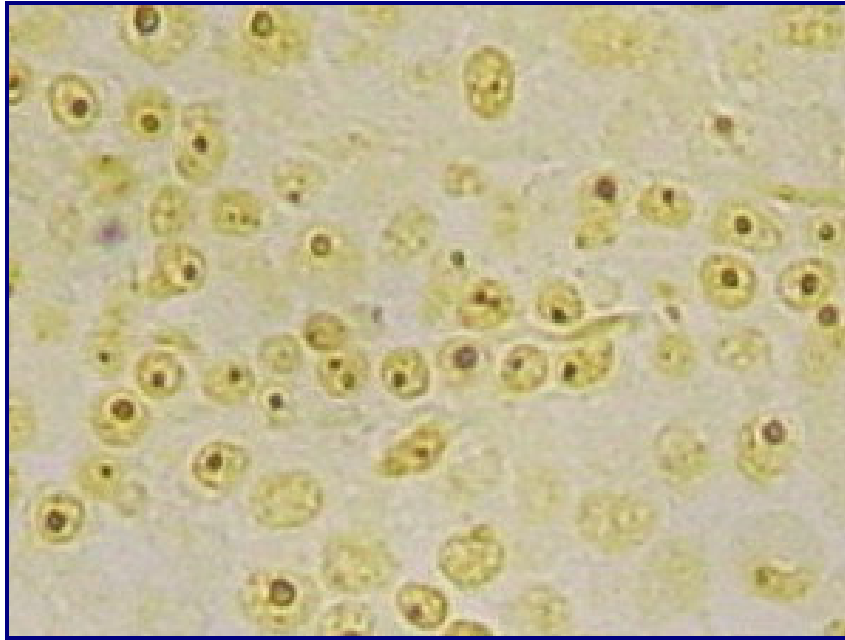


Figura 7: Visualización de los AgNORs en la célula neoplásica del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)

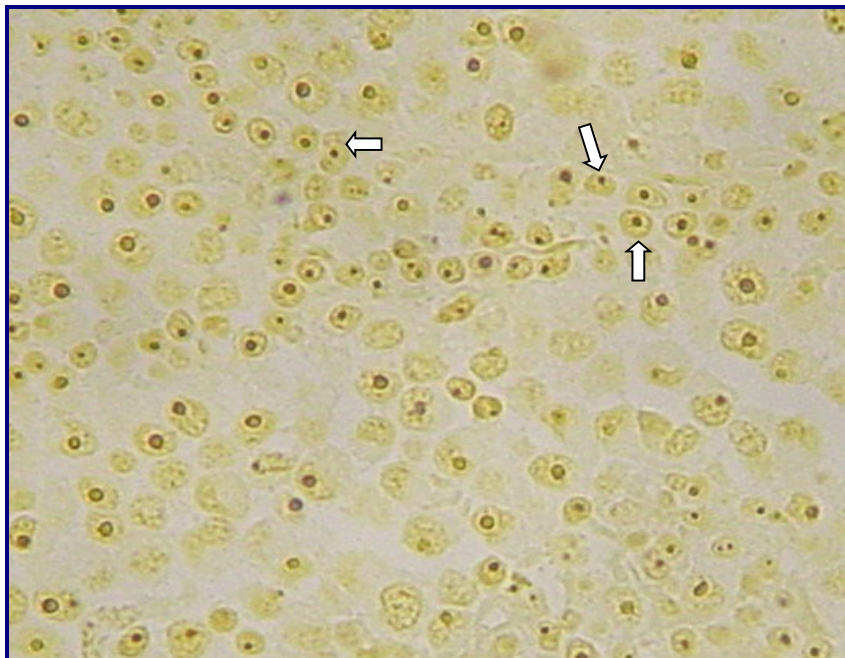


Figura 8: Histología de los AgNORs en el núcleo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (40x)



Figura 9: Histología de los AgNORs en el núcleo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)

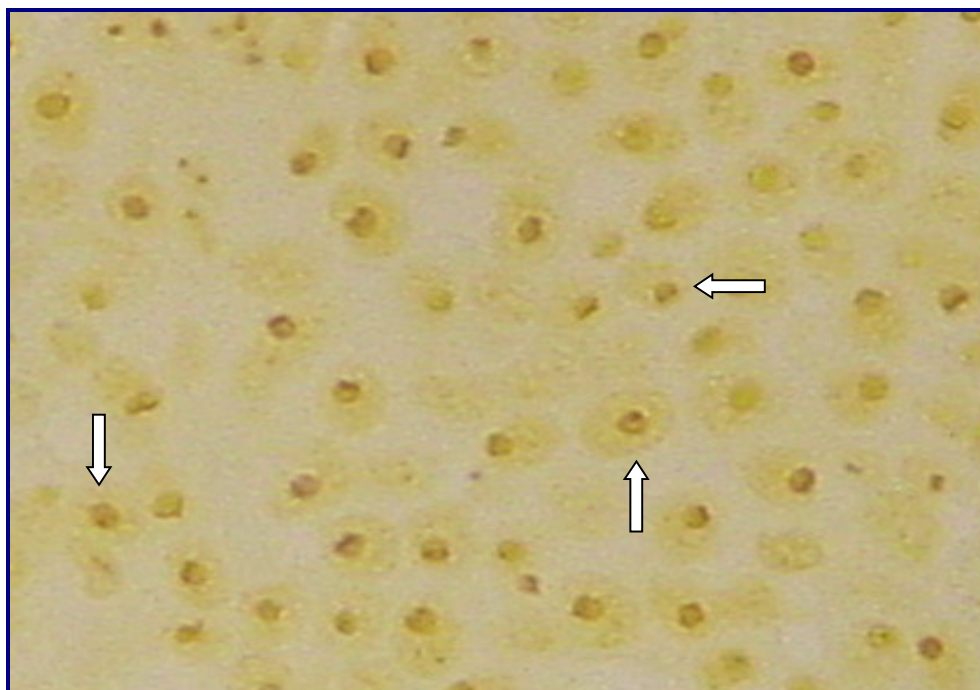


Figura 10: Histología de los AgNORs en el nucleolo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)

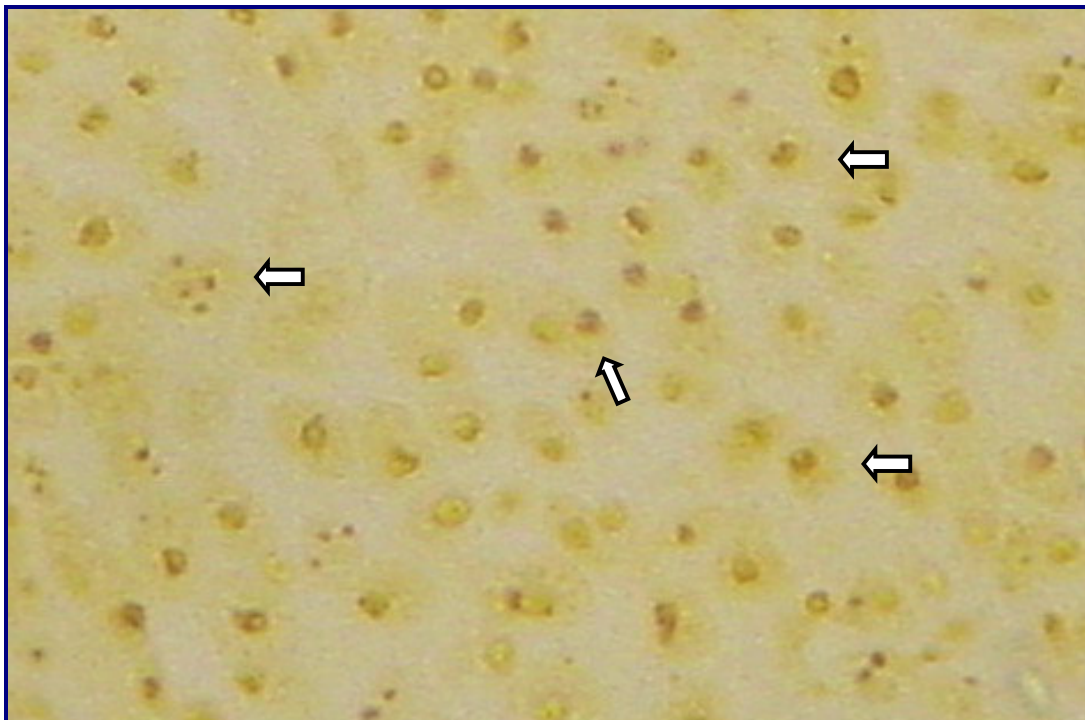
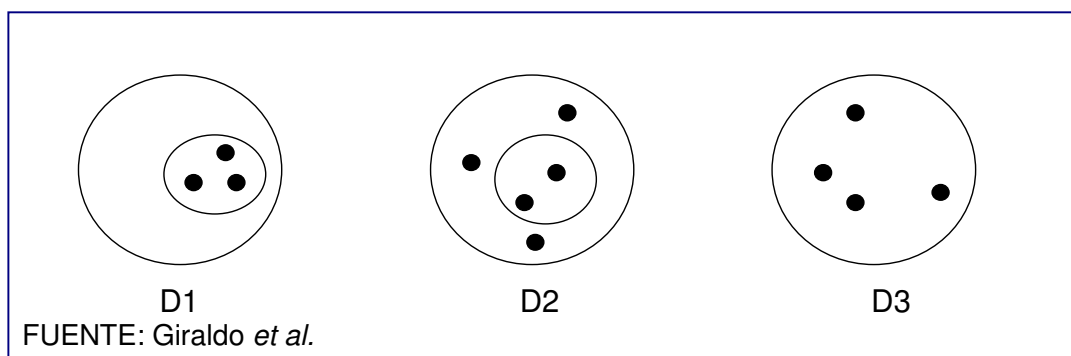


Figura 11: Histología de los AgNORs en el núcleo y nucleolo celular del Tumor Venéreo Transmisible canino (100x)



D1: AgNORs en el nucleolo.

D2: AgNORs en el núcleo y nucleolo.

D3: AgNORs en el núcleo.

Figura 12: Distribución de los AgNORs en las células neoplasias

V.- DISCUSIÓN

El principal objetivo del presente estudio fue visualizar los AgNORs en la célula neoplásica del TVT canino utilizando la tinción de nitrato de plata en tejidos embebidos en parafina y su posterior observación microscópica en campo claro a un aumento de 100x, siendo esta neoplasia susceptible a ser coloreado con plata para visualizar las estructuras formadoras de los NORs.

Al inicio del estudio se uso el protocolo de la técnica de tinción de Plotón (1986), pero los resultados no fueron los esperados, debido a que se observó una pobre calidad de impregnación argéntica y depósitos inespecíficos de plata, que dificultaron la correcta visualización de los AgNORs. Por este motivo se utilizó el protocolo propuesto por el Comité Internacional para la Cuantificación de los AgNORs, que viene a ser la técnica descrita por Plotón, modificada por Aubele (1994).

Se realizó además para este tipo de neoplasia la adición de algunos pasos a este último protocolo, consiguiendo así la óptima coloración de la totalidad de las muestras analizadas. Los pasos adicionados en el presente estudio fueron el tratamiento de las láminas con el tejido antes de la coloración argéntica, mediante la incubación en una estufa por 24 horas a 37° y la posterior exposición a temperatura ambiente por 24 horas, tal como lo reporta Trerè (2000).

Una vez estandarizado el protocolo las muestras archivadas desde el año 2000 no presentaron ningún problema con la coloración argéntica, ni con la coloración de hematoxilina y eosina; confirmando así principalmente la viabilidad de la tinción del nitrato de plata sobre tejidos parafinados archivados, tal como lo confirman Linder (1993) y Crocker (1992) en sus estudios.

Sin embargo, con respecto al método de cuantificación de AgNOR por célula se visualizaron, en un mínimo grupo, imágenes de algunos agregados inespecíficos como puntos pequeños dispersos en la zona nuclear que no presentaban las características propias del AgNOR; esto debido al producto del fijador empleado, el cual debe ser formol bufferado al 10% tal como lo indica Trerè (2000).

Se tomo como número apropiado para la cuantificación 100 células del tejido por animal para facilitar la distribución y el porcentaje de los AgNORs, aunque Simoes *et al.* (1994) establecen como número a contar de 20 a 30 células debido a que con un número dentro de este rango se alcanza la estabilidad estadística, por lo que utilizar un número mayor no alteraría el resultado, ya que el dato obtenido no se va a modificar.

En el presente trabajo la distribución de los AgNORs en el núcleo de la célula neoplásica del TVT canino fue de 60.7%. De acuerdo con Crocker (1992) existe una importante relación entre el grado malignidad y el grado de dispersión de los AgNORs en la célula, sugiriendo que la ubicación de estas sólo en el núcleo es común en células altamente malignas, confirmando así con lo que dice Moulton (1978), que el TVT canino histológicamente es una neoplasia maligna.

En cuanto al número medio de AgNORs por célula neoplásica del TVT canino, en el presente estudio se encontró que fue de 1.53. Investigaciones realizadas en otras neoplasias mencionan un incremento de AgNORs de acuerdo a la malignidad o al grado de la neoplasia; como lo reportan Yasdi y Taghavi

(2005) en estudios realizados en linfomas de Hodgkin's, donde la media de AgNORs fue de 1.66 para neoplasias de bajo grado y de 5.19 para las de alto grado. Por lo que un seguimiento en el tratamiento en el TVT canino determinaría la evolución de esta neoplasia, de acuerdo al número de AgNORs presente en la célula; considerando que existe TVT canino recidivante como lo menciona Díaz (Comunicación personal, 2007), y TVT canino que no cede al tratamiento con vincristina (Harmelin *et al.* 1995), ni con doxorubicina como lo menciona también Díaz (Comunicación personal, 2007).

El número de AgNORs por núcleo en la célula del TVT canino fue de 0.91 \pm 0.85 que coincide con lo reportado por Harmelin *et al* (1995) quienes encontraron un número de 1.6 AgNORs por núcleo celular en el TVT canino en un grupo de animales tratados con vincristina (2-6 dosis). Otro grupo de animales que recibieron 12 dosis de vincristina, donde 2 de ellos tuvieron que ser eutanasiados debido a que la invasión y metástasis de esta neoplasia fue muy agresiva; el número de AgNORs fue de 2.2 por núcleo celular. Lo que sugiere a decir que en un animal que presenta recidiva o metástasis muy agresiva, el número de AgNORs incrementa. Teniendo en cuenta que Harmelin *et al* (1995) no mencionan una evaluación de los AgNORs por núcleo celular del TVT canino antes de iniciar el tratamiento.

Arora *et al* (1996) indican que la tinción AgNOR puede ser usado como método para estimar la proliferación celular de una neoplasia, pudiendo diferenciar el tejido normal del crecimiento proliferativo no neoplásico, neoplásico benigno y neoplásico maligno en tejidos blandos; por lo tanto, se debería evaluar la presencia de AgNORs en histiocitos ya que de acuerdo con estudios inmunohistoquímicos existe reportes que avalan el origen histiocitario del TVT canino como lo mencionan Scott *et al* (2002) y así poder obtener parámetros para confrontar y compararlos con el Tumor Venéreo Transmisible canino.

La caracterización en base a parámetros de ubicación y cuantificación de los AgNORs en la célula del TVT canino establecería pautas para que en estudios posteriores se pueda evaluar el pronóstico y evolución del Tumor Venéreo Transmisible canino, como se realiza en otras neoplasias, debido a que la técnica AgNOR es un procedimiento fácil de realizar y puede ser un método auxiliar para monitorear individuos en grupo de riesgo para la prevención de neoplasias como lo sostienen Orellana *et al* (2004).

La coloración AgNOR se presenta en este trabajo como una nueva propuesta para ayudar al Médico Veterinario Patólogo a definir claramente la evolución y pronóstico del TVT canino, debido a que el aumento en el número de AgNORs es producto de una mayor síntesis de RNA ribosomal para poder mantener la demanda proteica de la neoplasia tal como lo reportan Derenzini (2000) y Plotón (1986); por lo tanto, la proliferación del AgNOR en la célula del TVT canino es un indicador de la agresividad y transformación maligna. De esta forma, la evaluación de las alteraciones nucleares que ocurren en las células neoplásicas del TVT canino pueden ser cuantificadas a través de la expresión de los AgNORs, como un indicador de la actividad metabólica proteica, evento que caracteriza a las células neoplásicas.

La técnica de impregnación de nitrato de plata esta ampliamente influenciado por varios factores (fijador, temperatura y duración de la reacción de la tinción) y pueden variar para cada neoplasia como lo afirman Derenzini (2000) y Trerè (2000). Pero para el presente estudio con la estandarización establecida, la técnica AgNOR es un parámetro accesible, reproducible, económico y comparable que se puede utilizar en forma rutinaria de manera paralela a la técnica histopatológica.

Además, hay que tener en cuenta otro factor en la evaluación de los AgNORs, la medida del área total de AgNORs por célula, la cual también es un indicativo de la actividad proliferativa de la célula neoplásica como se establecen en estudios realizados en otras neoplasias por Giraldo *et al.* (2003) y Harmelin *et al.* (1995), lo que establecería pautas para nuevas investigaciones en lo referente al Tumor Venéreo Transmisible canino.

VI.- CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de impregnación de nitrato de plata en la coloración de las Regiones Organizadoras Nucleolares Argénticas (AgNORs) de las células neoplásicas del Tumor Venéreo Transmisible canino, se concluye:

- Los resultados del presente estudio demostraron la presencia de los AgNORs en la célula del TVT canino.
- La distribución de los AgNORs en las células del TVT canino se presentaron en el núcleo y/o nucleolo, teniendo un mayor porcentaje las ubicadas en el núcleo (60.7%).
- El número medio de AgNORs por célula fue de 1.53.
- El número medio de AgNORs por núcleo celular fue de 0.91.
- El número medio de AgNORs por nucleolo celular fue de 0.62.

VII.- RECOMENDACIONES

- Utilizar el protocolo de la técnica de impregnación de nitrato de plata propuesto por el Comité Internacional para la Cuantificación de los AgNORs; debido a que en ella se hace uso del citrato buffer, el cual mejora la calidad de la tinción AgNOR.
- La ubicación y cuantificación de los AgNORs en la célula del TVT canino establecería pautas para que en estudios posteriores se pueda evaluar el pronóstico y evolución del Tumor Venéreo Transmisible canino, así como se realiza en otras neoplasias.
- Además, la medida del área total de AgNORs por célula también es un indicativo de la actividad proliferativa de la célula neoplásica, siendo otro parámetro a evaluar en la progresión del paciente con TVT canino.
- La técnica de impregnación de nitrato de plata para la visualización de los AgNORs es una herramienta auxiliar valiosa que todo Médico Veterinario Clínico de animales de compañía debería incluir en sus exámenes médicos, debido a que puede ser usado para el monitoreo de pacientes con neoplasias.

VIII.- BIBLIOGRAFIA CITADA

1. **Akhtar, G.N.; N.A. Chaudrhy; M. Tayyab; S.A. Khan. 2004.** AgNOR staining in malignant and benign effusions. Pak J Med Sci 20(1): 29-32.
2. **Aubele, M.; S. Bieterferd; M. Derenzini; P. Hufhagl; M. Martin; D. Öfner; J. Ruschoff. 1994.** Guidelines of AgNOR quantitation zentralol. Pathol. 140: 107-108.
3. **Arora, H.L.; N. Arora; R.L. Solanki. 1996.** Argyrophilic nucleolar organizer regions in soft tissue tumors. Indian J Pathol Microbiol. 39: 257-263.
4. **Cabrini, R.L.; A.E. Schwint; A. Méndez; F. Femopase; H. Lanfranchini; M.E. Itoiz. 1992.** Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 21: 275-279.
5. **Chevile, N.F. 1983.** Cell Pathology. 2nd ed. The Iowa State University Press. USA. 399-400.
6. **Cowell, R.I.; R.D. Tyler; J.H. Meinkoth. 1999.** Citología y Hematología Diagnóstica en el perro y gato. 2da ed Edit. Multimédica. España. 236-237.

7. **Crocker, J. 1992.** Nucleolar organizer regions and fibrilar In: Herrington C. (ed) Diagnostic molecular a practical approach oxford. Oxford. Press. 1: 221-238.
8. **Delahunt, B.; F. Avallone; J.L. Ribas; F.K. Mostofi. 1991.** Gold toning improves the visualization of Nucleolar Organizer Regions in Paraffin embedded Tissues. Biotechnic and Histochemistry. 66(6): 316-320.
9. **Derenzini, M. 2000.** The AgNORs. Micron. 31: 117-120.
10. **Derenzini, M.; D. Plotón. 1994.** Interphase nucleolar organizer regions. In: Crocker J. (Ed). Molecular biology in histopathology. Wiley New York. 231-249.
11. **Donofrio, V.; L. Lo Muzio; M.D. Mignogna; G. Troncone; S. Staibano; A. Boscaino; G. De Rosa. 1995.** Pronostic evaluation of HPV-associated precancerous and microinvasive carcinoma of the oral cavity: Combined use of Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). Eur J Cancer B Oral Oncol. 31B: 174-80.
12. **Ferreira, G. 2003.** Patología Veterinaria. 1ra ed. Universidad de Antioquia. Colombia. 510-511.
13. **Fonseca L.M.; M.A. Carmo. 2000.** AgNORs in Hyperplasia, Papilloma and Oral Squamous cell Carcinoma. Braz Dent J. 11(2): 105-110.
14. **Giraldo G.E.; D.A. Aranzazu; B. Rodríguez; M.M. Pérez; M.C. Ramírez. 2003a.** Caracterización de las regiones organizadoras Nucleolares coloreadas con plata (AgNORs) en tumores cutáneos caninos. Rev Col Cienc Pec 16(2): 132-138.

- 15. Giraldo G.E.; D.A. Aranzazu.; B. Rodríguez; M.M. Pérez; M.C. Ramírez. 2003b.** Caracterización de las regiones organizadoras Nucleolares coloreadas con plata (AgNORs) en tumores mamarios caninos. *Rev Col Cienc Pec* 16(1): 33-39.
- 16. Giuffrè, G.; R. Caruso; G. Barresi; G. Tuccari. 1998.** Prognostic significance of standardized AgNOR analysis in early and advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 433: 261-266.
- 17. Harmelin, A.; A. Zuckerman; A. Nyska. 1995.** Correlation of AgNOR Protein Measurements with Prognosis in Canine Transmissible Venereal Tumor. *J. Comp Path* 112:429-433.
- 18. Jones, T.; R. Hunt. 1990.** Patología Veterinaria. 5ta ed. Edit. Hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina. 1605-1607.
- 19. Jubb, K.; P. Kennedy; N. Palmer. 1992.** Patología de los animales domésticos. 3ra ed. Edit Agropecuaria Hemisferio Sur. Montevideo-Uruguay. 549-550.
- 20. Leyva, E.; E. Vega; M. Ramírez; A. Zarate. 2004.** Marcador de regiones organizadoras nucleolares en lesiones epiteliales de cavidad bucal. *Rev Esp Patol.* 37(3): 287-293.
- 21. Linder, L.E. 1993.** Improvements in the silver – Staining Technique for Nuclear Organizer Regions (AgNOR). *J Histochem cytochem.* 41: 439-445.
- 22. López-Muñiz, A.; A. Treviño; L. Hernández; A. Herrero. 2001.** Valoración de las regiones organizadoras nucleares en lesiones melánicas benignas y malignas de piel. *Rev Cubana Med.* 40(1): 17-23.

- 23. Mendoza, N. 2006.** Frecuencia del tumor venéreo transmisible en caninos: Casusística del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Periodo 1998-2004). Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 43 p.
- 24. Moulton, J.E. 1978.** Tumors in domestic animals. 2nd ed. University of California Berkeley and Los Angeles USA. 326-330.
- 25. Nikicicz, E.; D. Norvack. 1990.** Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. J Clin Pathol. 43: 723-727.
- 26. Öfner, D.; K.W. Schmid. 1996.** Standarized AgNOR analysis: its usefullness in surgical oncology. Histochem Cell Biol. 106: 193-196.
- 27. Orellana, A.; I. Espinoza; M. Franco; N. Jaimes-Freyre; A. Ortega. 2004.** Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral de individuos fumadores y no fumadores. Med Oral. 9: 197-203.
- 28. Palomo, M.; J. Perez; M. Rego; M. Lopez; C. Cañizares. 2002.** Evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR) en neoplasias foliculares tiroideas. Rev Esp Patol. 35(1): 95-100.
- 29. Pich, A.; L. Chiusa; E. Margaria. 2000.** Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. Micron. 31: 133-141.

- 30. Plotón, D.; M. Menager; P. Jeannesson; G. Himber; F. Pigeon; J. Adnet. 1986.** Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochemical Journal*. 18: 5-14.
- 31. Rebar, A.H. 1977.** Handbook of Veterinary Cytology. Realston Purina Company. USA. 42-43.
- 32. Roger, K.S. 1997.** Transmissible venereal tumor. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 1(9): 1036- 1045.
- 33. Rosciani A.S.; W.A. Merlo; L.E. Guaimás; A. Báez; M. Locket; G. Vera; J.E. López; V.M. Cejas; M.L. Piuzzi; O.A. Macció. 2003.** Evaluación de Factores Pronósticos en los Tumores Mamarios Caninos: Informe de avance. (Citodiagnóstico y determinación de Regiones Organizadoras de Nucleolos). Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003. 51: 1-4.
- 34. Ruschoff, J.; C. Prasser; T. Cortez; H.M. Hohne; W. Hohenberger; F. Hofstadter. 1993.** Diagnostic Value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: *Am J Surg Pathol*. 17 (12): 1281-1288.
- 35. Schwint, A.E.; T.M. Savino; H.E. Lanfranchini; E. Marschoff; R.L. Cabrini; M.E. Itoiz. 1994.** Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma or human oral mucosa. *Cancer*. 73: 2674-2679.
- 36. Scott, D.; W. Miller; C. Griffin. 2002.** Dermatología en pequeños animales. 6ta ed Edit. INTERMEDICA. Buenos Aires, República de Argentina. 1409-1412.

- 37. Silva, J.F.; J.J. Correia. 2003.** Um caso de adenocarcinoma prostático canino de baixa agressividade: Estudo dos AgNORs. *RPCV*. 98(547): 139-143.
- 38. Simoes J. P.; P. Schoning; M. Butine. 1994.** Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of the three methods. *Vet Pathol*. 31: 637-647.
- 39. Sirri, V.; P. Roussel; D. Hernández–Verdum. 2000.** The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle *Micron*. 31: 121-126.
- 40. Spiegel, M.R. 1991.** Estadística. 2da ed Edit Mc Graw Hill. Estados Unidos. 186-188.
- 41. Stephen, J.E. 1992.** Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. 3ra ed Edit Intermédica. Buenos Aires, República de Argentina. 1909-1910.
- 42. Trerè, D. 2000.** AgNOR staining and quantification. *Micron*. 31: 127-131.
- 43. Trigo, F. 1993.** Patología Sistémica Veterinaria. 2da ed Edit. Interamericana Mc Graw Hill. México. 21-213.
- 44. Trigo, F. 1998.** Patología Sistémica Veterinaria. 3ra ed Edit. Interamericana Mc Graw Hill. México. 191-192.
- 45. Vajdovich P.; R. Psáder; Z.A. Tóth; E. Perge. 2004.** Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Vet Pathol*. 41: 338-345.

- 46. Warnakulasuriya, K.; N. Jonson. 1993.** Nucleolar organizer region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 22: 77-81.
- 47. Xie, X.; C.O.P. Frass; J. Subdo; M. Boysen. 1997.** Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, displasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *American Cancer Society.* 79: 2200-2208.
- 48. Yazdi, I.; N. Taghavi. 2005.** The assessment of AgNORs in grading of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. *Arch Iranian Med* 8(4): 282-285.
- 49. Zuccari, D.A.; A.E. Santana; N.S. Rocha. 2002.** Expressao dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 54(6): 1-11.

IX.- APENDICE

APÉNDICE Nº 1. TÉCNICA DE TINCIÓN DE PLATA DE UN PASO (PLOTÓN *et al.* 1986)

I. Preparación de las muestras histológicas

- Cortar los bloques de parafina en secciones de 3-4 μm de grosor.
- Realizar varios baños en xileno, con la finalidad de quitar la cera.
- Hidratar las muestras a través de alcoholes graduados.
- Lavar en agua destilada.

II. Preparación de la solución de tinción

Dos soluciones son necesarias:

La primera (solución A) es una solución de gelatina al 2% disuelta en agua destilada, a la cual se le añadirá el ácido fórmico para hacer una solución final al 1%.

La segunda (solución B) es una solución de nitrato de plata al 50% disuelta en agua destilada.

La solución de tinción es obtenida instantáneamente por la rápida mezcla de una parte de la solución A con dos partes de la solución B en un frasco cilíndrico.

III. Tinción de plata de las NOR

La solución de tinción ($\approx 0.3 \text{ ml}$) es inmediatamente vertida en cada lámina. La tinción toma 14 – 20 minutos a temperatura ambiente, dependiendo de la intensidad deseada de la reacción. Aunque la protección de la luz no es necesaria, es mejor evitar la luz directa del sol durante la tinción con plata. Después de la tinción, las láminas son lavadas en varios baños con agua destilada, para luego ser colocadas por 10 minutos en una solución de tiosulfato, finalmente son lavadas nuevamente en varios baños de agua destilada, deshidratadas y montadas.

**APÉNDICE Nº 2. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE PLATA SEGÚN LO
PROPUESTO POR EL COMITÉ INTERNACIONAL PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE LOS AgNORs (AUBELE *et al.*, 1994)**

- Quitar la cera de las secciones en xileno.
- Hidratar las secciones a través de alcoholes graduados y en agua destilada para evitar cualquier post-fijación adicional en los fijadores a base de alcohol.
- Las secciones son sumergidas en amortiguador de citrato de sodio (monohidrato de citrato de sodio 0.01 M, pH 6.0) en vasijas plásticas Coplin y puestas a hervir a 120°C por 20 minutos en autoclave húmeda u olla a presión.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Lavar con agua destilada.
- Preparar una solución consistente de una solución de gelatina al 0.6% disuelta en agua destilada, a la cual se le añade el ácido fórmico para hacer una solución final al 0.33%. Pre-calentar a 37°C.
- Disolver el nitrato de plata en la solución de gelatina-ácido fórmico para hacer una solución final al 33%, y sumergir las láminas inmediatamente en la solución obtenida. Teñir en la oscuridad a una temperatura constante de 37°C por 13 minutos. Quitar la solución y lavar las láminas en varios baños de agua destilada, deshidratar y montar.

APÉNDICE Nº 3. PREPARACIÓN DEL BUFFER CITRATO (pH=6)

Solución de ácido cítrico 0.1 M

- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7H_2O$) 21.01gr
- Agua destilada 100.00ml

APÉNDICE Nº 4. PREPARACIÓN DEL NITRATO DE PLATA

- Disolver 2 gr. de gelatina en 100 ml de agua destilada a 70-75°, luego dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 1 ml de ácido fórmico.
- Diluir la solución con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 300 ml.
- Disolver 16 gr de nitrato de plata en 45 ml de la solución anterior.

APÉNDICE Nº 5. DISTRIBUCION DE LA POBLACION ANIMAL CON TVT canino EN BASE AL SEXO, EDAD Y UBICACION

SEXO	EDAD (años)	UBICACIÓN	Nº ANIMALES
HEMBRA	4 - 9	genital	7
	4 - 8	extragenital	7
MACHO	2 - 8	genital	9
	4 - 9	extragenital	7

**APÉNDICE Nº 6. MUESTRAS TOMADAS AL AZAR DE CASOS
DIAGNOSTICADOS HISTOPATOLOGICAMENTE COMO TVT
DE LOS ARCHIVOS DEL LABORATORIO DE HISTOLOGÍA,
EMBRIOLOGÍA Y PATOLOGÍA VETERINARIA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS**

IDENTIFICACION	SEXO	EDAD (años)	UBICACION	RAZA
1	macho	5	genital	cruzado
2	macho	6	extragenital	pastor alemán
3	hembra	4	genital	cruzado
4	macho	6	genital	cruzado
5	macho	6	extragenital	cocker
6	hembra	8	extragenital	cruzado
7	macho	2	genital	bóxer
8	macho	8	genital	cruzado
9	hembra	4	extragenital	cruzado
10	macho	6	extragenital	pastor alemán
11	hembra	9	genital	cruzado
12	hembra	7	genital	cruzado
13	macho	4	extragenital	cocker
14	hembra	9	genital	cruzado
15	hembra	7	extragenital	cruzado
16	macho	8	extragenital	cruzado
17	hembra	9	genital	cruzado
18	macho	5	genital	cruzado
19	hembra	5	extragenital	cruzado
20	macho	5	genital	labrador
21	hembra	4	extragenital	cruzado
22	macho	5	genital	cruzado
23	hembra	4	genital	cruzado
24	macho	8	extragenital	cruzado
25	hembra	6	genital	golden
26	hembra	4	extragenital	cruzado
27	macho	9	extragenital	bóxer
28	macho	5	genital	cruzado
29	hembra	8	extragenital	cruzado
30	macho	6	genital	cruzado